製品コード RR255A

検便検査用

TaKaRa

TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット

説明書

v201510Da

ノロウイルスは、急性胃腸炎の主要な原因ウイルスです。感染源は、感染者の排泄物（便あるいは吐物）やノロウイルスを保有する二枚貝（カキなど）と推定されています。感染すると数日の潜伏期間後に、主に嘔吐、下痢、腹痛、発熱（37 ～ 38℃）などの症状が現れます。
ノロウイルスは、構造的に表面をカップ状の窪みをもつタンパク質で覆われ、内部にプラス 1 本鎖 RNA のゲノムを有しています。今のところ、組織培養法などを用いて分離・検出が困難なため、逆転写 PCR 法やリアルタイム PCR 法などによって、ウイルスの検査診断が行われています。ノロウイルスは Genogroup I ～ V の 5 つの遺伝子群に分類され、ヒトは Genogroup I (GI) と II (GII) に感染することが示唆されています。

本製品は、リアルタイム PCR により検便検体からノロウイルス（GI および GII）遺伝子を検出するためのキットです。
GI および GII 遺伝子の検出には、厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課より通知された「ノロウイルスの検出法について」（食安監発第 1105001 号、最終改正：平成 25 年 10 月 22 日付け食安監発 1022 第 1 号）に収載されたものと同じ配列のプライマー、プローブを使用しています。

特長

- 簡単な前処理を行うだけで、検便検体からリアルタイム RT-PCR の鋳型を調製することができます。RNA の精製は必要ありません。
- One Step のリアルタイム RT-PCR 法で、逆転写反応とリアルタイム PCR を連続的に行います。
- TaqMan® プローブによるマルチプレックス検出を行います。1 反応で GI 遺伝子、GII 遺伝子、インターナルコントロールを同時に検出し、GI と GII を明確に区別できます。

【検出対象遺伝子とプローブの標識】

検出対象遺伝子	プローブの標識
GI 遺伝子	FAM（レポーター）／ダーククエンチャー
GII 遺伝子	ROX（レポーター）／ダーククエンチャー
インターナルコントロール	Cyanine5（レポーター）／ダーククエンチャー

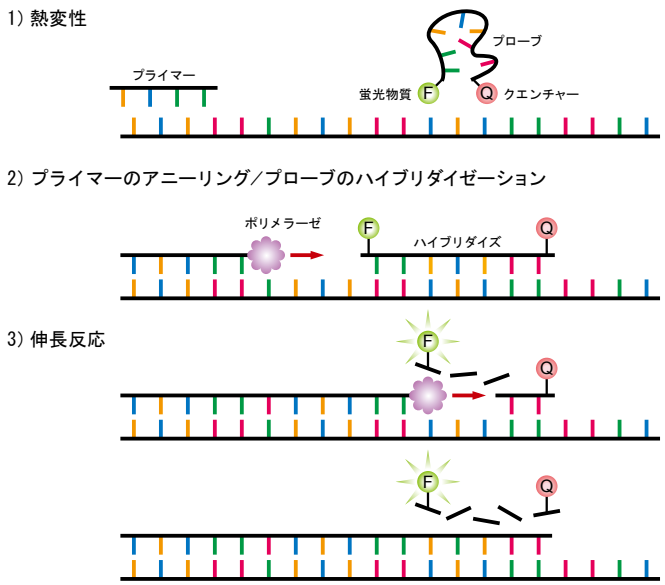


図 1. TaqMan プローブ法の原理

I. キットの内容（100 回分）

1.	Lysis Buffer (NV)	1 ml × 2 本
2.	PCR Buffer (NV)＊1	950 µl × 2 本
3.	Enzyme Mix (NV)＊2	100 µl
4.	NV Primer/Probe Mix＊3	250 µl
5.	NV Positive Control DNA	50 µl（20 回分）

＊ 1：dNTP Mixture および Mg^{2+} を含む。
＊ 2：PrimeScript™ RTase、RNase Inhibitor、*TaKaRa Ex Taq*® HS を含む。
＊ 3：蛍光標識プローブを含んでいるため、遮光に留意すること。

II. 保存

－ 20℃（輸送、保存とも）

III. キット以外に必要な器具、機器（主なもの）

【器具】
・200 µl、20 µl、10 µl　各マイクロピペット
・マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

【機器】
・微量高速遠心機
・サーマルサイクラーまたはヒートブロック等（90℃、5 分の熱処理に使用します。）
・リアルタイム PCR 装置（FAM、ROX、Cy5 を検出可能なもの）

Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Cy5) with PC（製品コード TP990）
Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
注：TP900/TP960/TP700/TP760 は、Cy5 オプションフィルターの追加が必要です。
Filter Unit (Cy5) for Thermal Cycler Dice Real Time System（製品コード TP803）
Filter Unit (Cy5) for LED（製品コード TP703）

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System（BIO-RAD 社）
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）
注：Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System は使用できません。

IV. 使用に際して

本キットを使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用目的：本キットは検便検査に使用する製品です。
2. 測定結果：本キットは遺伝子検出であるため、不活化されたウイルスも検出されます。（検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は、一切の責任を負いません。）
3. 廃棄：　試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチックなどの試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

V. 操作上の注意

1. Enzyme Mix (NV) は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50%グリセロール溶液で粘度が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。

2. 試薬の分注を行うときは、必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。

3. 万一、サンプルやプローブ、プライマーが核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋着脱およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。

4. 反応液の調製から検出まで、次の 3 エリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
   ○エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
   ○エリア 2：検体の調製を行います。
   ○エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。
   本キットでは増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

5. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。

6. 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。リアルタイム PCR 補正機能などが適正に作動しない場合、誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

7. プライマーならびにプローブ配列に該当する箇所に新たに変異が起こったノロウイルスは、検出ができない場合があります。

VI. 操作

【 コントロール反応について 】

結果の判定を正しく行うため、以下のコントロール反応を同時に行ってください。

陰性コントロール
便検体の懸濁に使用する溶液（生理食塩水や PBS 等）を「陰性コントロール」として使用します。便検体の懸濁液と同様に操作してください。

陽性コントロール
リアルタイム RT-PCR 反応の際に、本製品の NV Positive Control DNA を鋳型とした反応を「陽性コントロール」として実施します。

1. 便検体懸濁液の調製（エリア 2 で実施）

1）便検体を生理食塩水や PBS 等に 5 ～ 10% 濃度となるように懸濁する。
陰性コントロールとして、便検体を含まない溶液（生理食塩水や PBS）を用意し、以降の操作を同様に行う。

2）10,000 ～ 15,000 rpm で 5 分間遠心する。
上清をサンプル（便検体懸濁液）として用いる。

2. 前処理

1）便検体懸濁液と Lysis Buffer を以下のように混合する。

便検体懸濁液	5 µl
Lysis Buffer (NV)	20 µl
Total	25 µl

2）90℃、5 分の熱処理を行う。（注：熱処理後のサンプルは保存できません。）

3. リアルタイム RT-PCR

1）以下の反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）
必要数＋α分の反応液をまとめて調製し、リアルタイム PCR 用チューブに 22.5 µl ずつ分注する。必要本数は、サンプル数＋ 2 本（陽性コントロール、陰性コントロール）と設定する。

（1 反応分の反応液）

PCR Buffer (NV)	19.0 µl
Enzyme Mix (NV)	1.0 µl
NV Primer/Probe Mix	2.5 µl
Total	22.5 µl

2）熱処理済のサンプル（陰性コントロールを含む）または NV Positive Control DNA を 2.5 µl 添加する。（エリア 3 で実施）

3）以下の条件で反応を実施する。

【Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズおよび
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を用いる場合 】

＜逆転写反応＞
42℃　5 分
＜初期変性＞
95℃　30 秒
＜ PCR：40 サイクル＞
95℃　5 秒
56℃　1 分（蛍光検出：FAM, ROX, Cy5）

注：Thermal Cycler Dice Real Time System III（製品コード TP990）の場合、Speed は Normal を選択してください（デフォルト設定から変更不要）。
Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900）や *Lite*（製品コード TP700）では、Speed は Fast を選択してください（デフォルト設定から変更不要）。

【CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System を用いる場合 】

＜逆転写反応＞
42℃　5 分
＜初期変性＞
95℃　30 秒
＜ PCR：40 サイクル＞
95℃　5 秒
56℃　1 分 20 秒（蛍光検出：FAM, ROX, Cy5）

4. 判定

陽性コントロールおよび陰性コントロールが正しく反応していることを確認したうえで、測定対象サンプルの判定を行ってください。

【検出対象遺伝子と確認するデータ】

検出対象遺伝子	確認する蛍光フィルター
GI 遺伝子	FAM 蛍光フィルター
GII 遺伝子	ROX 蛍光フィルター
インターナルコントロール（IC）	Cy5 蛍光フィルター

【コントロール反応の正しい結果】

	GI (FAM)	GII (ROX)	IC (Cy5)
陽性コントロール	＋	＋	＋／－
陰性コントロール	－	－	＋

- 陽性コントロールで GI または GII が検出されない場合は、何らかの原因で PCR 反応や検出が正常に行われていない。再反応を行う。
- 陰性コントロールで GI または GII が検出された場合は、コンタミネーションの疑いがある。反応液の調製場所や器具類を除染したうえで再反応を行う。

【測定対象サンプルの判定（陽性判定の例）】

GI (FAM)	GII (ROX)	IC (Cy5)	判定
＋	－	＋／－	GI 陽性
－	＋	＋／－	GII 陽性
＋	＋	＋／－	GI/GII 陽性

- GI または GII が検出された場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

【測定対象サンプルの判定（陰性検体の例）】

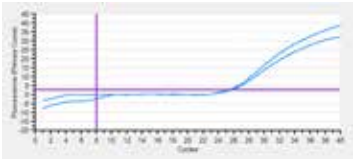
GI (FAM)	GII (ROX)	IC (Cy5)	判定
－	－	＋	検出限界以下
－	－	－	判定不能

- GI、GII 共に検出されなかった場合には、IC の結果を確認する。
- IC が検出されていれば、検出限界以下となる。
- IC が不検出の場合は、PCR 阻害の疑いがある。サンプルを希釈するか、RNA 精製を行って再測定する。

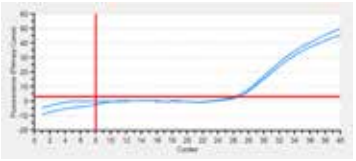
VII. 反応例

陽性コントロールの反応例

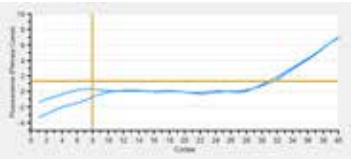
GI (FAM)



GII (ROX)

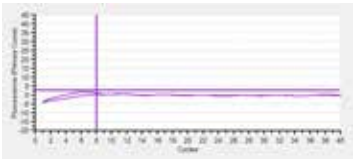


IC (Cy5)

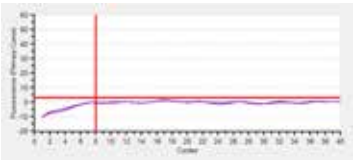


陰性コントロールの反応例

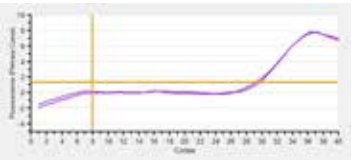
GI (FAM)



GII (ROX)

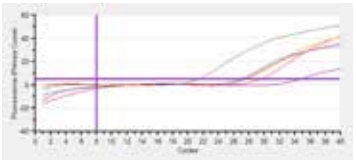


IC (Cy5)

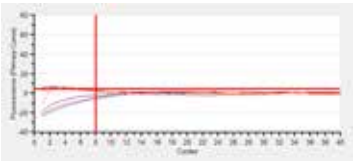


GI 陽性検体の反応例

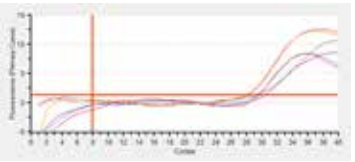
GI (FAM)



GII (ROX)

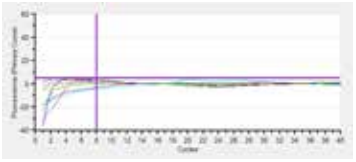


IC (Cy5)

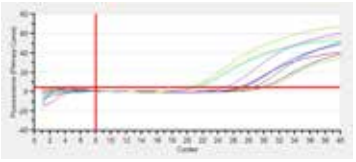


GII 陽性検体の反応例

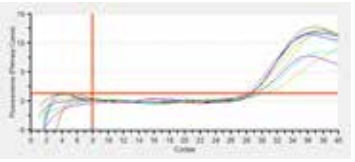
GI (FAM)



GII (ROX)

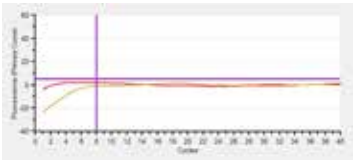


IC (Cy5)

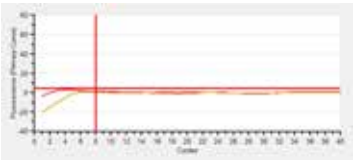


陰性検体の反応例

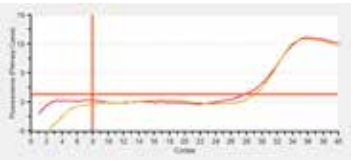
GI (FAM)



GII (ROX)



IC (Cy5)



VIII. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Cy5) with PC（製品コード TP990）
0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ902）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Filter Unit (Cy5) for Thermal Cycler Dice® Real Time System（製品コード TP803）
Filter Unit (Cy5) for LED（製品コード TP703）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit（製品コード RR250A/B）

IX. 注意

- 本製品は、検便検査用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Thermal Cycler Dice、*TaKaRa Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の、TaqMan は Roche Diagnostics GmbH の登録商標です。PrimeScript はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201510Da